

PRV

PATENT- OCH REGISTRERINGSVERKET
Patentavdelningen

PCT/SE 98/02463

REC'D 17 FEB 1999

WIPO PCT

Intyg
Certificate

22/07 EAJU

Härmed intygas att bifogade kopior överensstämmer med de handlingar som ursprungligen ingivits till Patent- och registreringsverket i nedannämnda ansökan.

This is to certify that the annexed is a true copy of the documents as originally filed with the Patent- and Registration Office in connection with the following patent application.



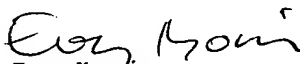
(71) Sökande Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Uppsala SE
Applicant (s)

(21) Patentansökningsnummer 9704934-0
Patent application number

(86) Ingivningsdatum 1997-12-30
Date of filing

Stockholm, 1999-02-11

För Patent- och registreringsverket
For the Patent- and Registration Office


Evy Morin

Avgift
Fee

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

PATENT- OCH
REGISTRERINGSVERKET
SWEDEN

Postadress/Adress
Box 5055
S-102 42 STOCKHOLM

Telefon/Phone
+46 8 782 25 00
Vx 08-782 25 00

Telex
17978
PATOREG S

Telefax
+46 8 666 02 86
08-666 02 86

ANALYSFÖRFARANDE MED TILLSÄTTNING I TVÅ ELLER FLERA POSITIONER.**Teknikområde**

Uppfinningen avser ett förfarande för att bestämma en analyt i ett prov med hjälp av biospecifika affinitetsreaktanter 5 (Reaktant 1, Reaktant 2 etc), av vilka en är analytiskt detekterbar (Reaktant*) och en är fast förankrad i en detektionszon i en flödesmatris (Reaktant I). Provet (analyten) förs av ett transportflöde i matrisen från en appliceringszon för vätska (VZP) innehållande analyten (provet) och/eller buffert till 10 detektionszonen (DZ), i vilken Reaktant I är fast förankrad. Samtidigt med att provet transporteras i matrisen transporteras även de av reaktanterna som är lösliga, inklusive Reaktant*. I detektionszonen fångas Reaktant* upp i en mängd som är relaterad till mängden analyt i provet. För att detta skall kunna ske 15 är Reaktant* vald så att den kan biospecifikt binda direkt till Reaktant I eller indirekt via en eller flera tillsatta biospecifika affinitetsreaktanter (inkluderande analyten). Mängden analyt bestäms sedan ur mängd Reaktant* som bundits till i detektionszonen. I transportflödet kan finnas zoner, i vilka olika biospecifika affinitetsreaktanter (exempelvis Reaktant*, 20 dock ej analyt) applicerats i förväg (fördeponerats) för att upplösas och transporteras med flödet mot detektionszonen.

Med reaktanter (inkluderande analyten), som uppvisar biospecifik affinitet (bioaffina reaktanter), avses enskilda medlemmar i reaktantparen: antigen/hapten - antikropp; biotin - avidin/streptavidin; två komplementära enkelkedjor av nukleinsyra etc. Till antikroppar räknas antigen-bindande antikroppsfragment såsom Fab, $F(ab)_2$, enkelkedje Fv antikroppar (scFv) etc. 25 Aktuella reaktanter behöver inte vara naturligt förekommande utan kan även vara syntetiskt framställda molekyler/bindare. 30

Den aktuella typen av testmetodik har tidigare främst utnyttjats för biospecifika affinitetsreaktanter där minst den ena i ett utnyttjat reaktantpar har uppvisat proteinstruktur, speciellt i samband med så kallade immunkemiska bestämningsförfaranden. 35

Biospecifika affinitetsreaktionerna utföres främst i vattenhaltiga medier (exempelvis vatten).

Den aktuella tekniken är välkänd och har ofta applicerats på så kallade testremsor, där remsan fungerat som flödesmatris. Flödet har initierats i den zon till vilken provet sätts (VZP). Flödet har ofta varit lateral, d.v.s. parallellt med matrisens yta, eller av andra typer, exempelvis i djupled av matrisen.

Testprotokollen har varit av så kallad inhibitionstyp (kompetitiva) eller av icke-inhibitionstyp (icke-kompetitiva, sandwich). Se t.ex. Behringwerke US 4,861,711; Unilever WO 8808534; Abbot US 5,120,643; Becton Dickinson EP 284,232 och US 4,855,240; Abbot/Syntex US 4,740,468; Pharmacia AB, WO 9622532 etc.

I sammanhanget talar man ofta om simultana och sekventiella metoder (protokoll) med avseende på vissa reaktanter (speciellt analyt och Reaktant*). Simultana varianter innebär att analyt (prov) och aktuell reaktant, exempelvis Reaktant*, transporteras in i detektionszonen samtidigt. Simultana varianter kan man få, om prov förinkuberas/blandas med Reaktant* eller om Reaktant* fördeponerats i appliceringszonen för prov eller i en zon nedströms appliceringszonen för prov men före detektionszonen. Sekventiella varianter innebär att analyt (prov) transporteras före en reaktant, exempelvis Reaktant*, in i detektionszonen. Sekventiella varianter kan man få, om aktuell reaktant, exempelvis Reaktant*, sätts till samma appliceringszon som provet efter det att provet (analyten) transporterats ut ur zonen. En variant av sekventiell metodik diskuteras i US 4,855,240 (Becton & Dickinson). Mot alternativet att prov (analyt) skall transporteras före "tracer" (=Reaktant*) i samma transportflöde, ställer US 4,855,240 skilda transportflöden, i vilka man reglerar transporttiden så att prov (analyt) når detektionszonen före "tracer" (Reaktant*).

I begreppet simultana tester har man ofta inkluderat varje variant, i vilken prov och Reaktant* förinkuberas/blandas innan de sättes till en flödesmatris eller i vilken prov sättes till

en flödesmatris i vilken Reaktant* är fördeponerad i appliceringszonen för prov eller nedströms denna. På liknande sätt har man i begreppet sekventiella tester inkluderat varje variant, i vilken Reaktant* sättes till appliceringszonen för prov först sedan provet vandrat ut ur sin appliceringszon. Man har alltså inte taget hänsyn till, om ordningen av analyt och Reaktant* förändras under transporten till detektionszonen. Om inget annat anges, användes denna nomenklatur även i föreliggande uppfinning, men nu anpassad till att det finns flera appliceringszoner för vätska. Detta synsätt innebär att man främst betraktar den initiala ordningen, när både analyt och Reaktant* är i löst form, och inte ordningen i vilken analyt och Reaktant* transporteras in i detektionszonen.

15 Nackdelar med tidigare teknik och mål med uppfinningen.

Tidigare känd teknik har ofta inneburit praktiska problem vid automatisering, främst på grund av att det ofta krävts förinkubering eller sekventiell tillsättning av prov och reaktanter, ofta i en viss förutbestämd ordning definierad av det testprotokoll, som skall användas. Uppfinningens mål är att (a) underlätta automatisering, (b) undvika sekventiell tillsättning av prov och den analytiskt detekterbara reaktanten (Reaktant*) vid sekventiell metodik, och (c) möjliggöra fördeponerad Reaktant* vid sekventiell metodik, som avser analyt och Reaktant*. Mer generella mål är att uppnå högkvalitativa testresultat, gärna med förbättrad sensitivitet, och precision än tidigare varianter gett.

Uppfinningen

30 Vi har nu överraskande upptäckt, att, om flöde initierats genom i stort sett samtidig tillsättning av vätska till två intill varandra belägna zoner i en flödesmatris, vandrar vätska tillsatt i den nedströms belägna zonen före vätska tillsatt i den uppströms belägna zonen i riktning mot detektionszonen. Vår upptäckt innebär, att man även kan få zonvis vandring av väts-

kor om tillsättning av vätska i en uppströms belägen zon sker efter tillsättning av vätska i närmast nedströms belägna zon. Genom att tillämpa denna upptäckt på den aktuella typen av analysmetoder, kan man uppnå förbättringar med avseende på ovan 5 angivna mål.

En första huvudaspekt av uppfinningen avser de inledningsvis nämnda analysmetoderna och kännetecknas av att

A. flödesmatrisen uppvisar minst två appliceringszoner för vätska:

10 $VZ_m \dots VZ_n \dots VZ_1 \quad DZ$
 ----- >

där

- a) VZ_n är en appliceringszon för vätska, där n är positionen för appliceringszonen VZ_n (n är heltal $2 < n \leq m$)
 15 b) m är totala antalet appliceringszoner, i vilka flöde initieras,
 c) en VZ_n är appliceringszon för prov ($VZ_n.P$) och en VZ_n är appliceringszon för Reaktant* ($VZ_n.R^*$) med $n'' \geq n'$,
 d) ----- > är riktningen på flödet, och
 20 e) DZ är detektionszon, och

B. man initierar flöde genom att sätta vätska till vardera zonen $VZ_m \dots VZ_n \dots VZ_1$ på sådant sätt att vätska _{$n+1$} , som sätts till appliceringszon (VZ_{n+1}), transporteras genom matrisen efter vätska _{n} som sätts till närmast nedströms belägna appliceringszon VZ_n .
 25

Vätska _{$n+1$} kan lätt fås att vandra omedelbart efter vätska _{n} , om motsvarande zoner för applicering av vätska ligger intill varandra eller om tillsätta vätskevolymmer anpassas för detta mål.

I det vanligaste fallet innebär det ovan sagda att man sätter 30 vätska _{$n+1$} till VZ_{n+1} före eller i huvudsak samtidigt med att man sätter vätska _{n} till VZ_n . För $n = m$ saknas VZ_{n+1} , varför det för

den zonen inte går att sätta någon vätska till VZ_{m+1} . Praktiska fördelar uppnås om tillsättningen är i huvudsak samtidigt för alla $VZ_m \dots VZ_n \dots VZ_1$.

Antalet (m) appliceringszoner för vätska ($VZ_m \dots VZ_n \dots VZ_1$) kan i princip vara hur många som helst med undantag av en ($m \neq 1$). Av praktiska skäl är det troligt att i framtiden $2 \leq m \leq 10$, med företräde för $2 \leq m \leq 6$, såsom $m = 2$ eller 3 eller 4 eller 5.

Vätskorna, som tillsättes, (vätska₁ . . . vätska_m) kan bestå av enbart buffertlösning eller av buffertlösning plus en reaktant (Reaktant 1, Reaktant 2 etc), som behövs för att Reaktant* skall kunna fångas upp i detektionszonen i en mängd, som är relaterad till mängden analyt i provet. Även Reaktant* kan ingå i en vätska_n. Som regel gäller att sammansättningen av transport-erade komponenter från en appliceringszon ej är samma som från närmast initlliggande appliceringszon, i vilken flöde initieras (VZ_{n+1} och VZ_{n-1} med undantag för $n = m$ och $n = 1$ för vilka zoner VZ_{n+1} respektive VZ_{n-1} saknas).

Appliceringszonerna för vätska kan ligga intill varandra eller med ett mellanliggande område av matris.

En vätska tillsatt i en appliceringszon kan ha en tendens till att sprida sig ovanpå matrisen till matrisdelar, som ligger utanför zonen. För närliggande zoner innebär detta att vätskor kan blanda sig med varandra på ett icke-önskvärt sätt. För att undvika detta placerar man gärna fysiska barriärer, som avgränsar två närliggande appliceringszoner (zonavgränsare). Barriärerna bör först och främst vara placerade ovanpå matrisen, men kan stäcka sig ner i matrisen utan att helt strypa flödet. Avgränsningen är främst mot en närliggande zon för applicering av vätska, men kan givetvis sträcka sig runt en hel appliceringszon för vätska.

Aktuella reaktanter kan vara fördeponerade i en appliceringszon för vätska (VZ_n) eller mellan två sådana zoner. En appliceringszon för vätska, som bara är avsedd att transportera buffrande komponenter och/eller andra komponenter som ej deltar i 5 de biospecifika affinitetsreaktionerna (d.v.s. vätska som varken innehåller eller är avsedd att transportera någon reaktant eller analyt), kallas fortsättningsvis för VZ_nB . En appliceringszon för vätska (VZ_n), där vätskan innehåller en reaktant eller är avsedd att transportera en reaktant, exempelvis Reaktant*, Reaktant 1, Reaktant 2 etc, kallas fortsättningsvis 10 VZ_nR^* , VZ_nR_1 , VZ_nR_2 etc. Skall vätska_n transportera en kombination av komponenter, exempelvis Reaktant* och analyt (prov) blir appliceringszonen gemensam för komponenterna och betecknas VZ_nR_2/R_1 etc. För kombinationen prov och Reaktant* 15 blir appliceringszonen VZ_nR^*/P ($n' = n''$). Att vätska_n är avsedd att transportera en viss reaktant inkluderar att reaktanten ifråga även kan vara fördeponerad i zonen VZ_n . Det senare inkluderar att reaktanten kan vara fördeponerad i ett område nedströms appliceringszonen för den aktuella vätskan men uppströms närmast nedströms belägna VZ (VZ_{n-1}), eller om $n = 1$ enbart uppströms detektionszonen (eftersom VZ_{n-1} då saknas).

Med fördeponering avses att en reaktant är tillsatt i förväg till matrisen och på sätt som gör att den ej sprider sig i matrisen förrän den nås av vätska, som applicerats för att initiera 25 ra flöde. Fördeponering av reaktanter kan ske på i och för sig känt sätt. Se till exempel (Behringwerke US 4,861,711; Unilever WO-8808534; Abbott US 5,120,643; Becton Dickinson EP 284,232). Det är viktigt att man arrangerar, så att reaktanten i fråga snabbt går i lösning, när vätska passerar ett område, som inne- 30 håller fördeponerad reaktant. För att uppnå snabb upplösning har det varit vanligt att inkorporera reaktanter i substanser som i sig snabbt löses. Denna typ av substanser är ofta hydro-

fila med polära och/eller laddade grupper, såsom hydroxy, karboxy, amino, sulfonat etc. Speciellt kan nämnas hydrofila snabblösliga polymerer, exempelvis med kolhydratstruktur, enkla socker inkluderande mono-, di- och oligosackarider och motsvarande sockeralkoholer (mannitol, sorbitol etc). Vanligt är att man först belägger den aktuella appliceringszonen med ett skikt av den snabblösliga substansen, varefter reaktanten appliceras, eventuellt följt av ytterligare ett skikt snabblöslig substans. Ett alternativt sätt är att inkorporera reaktanten i partiklar av snabblösligt material som sedan deponeras i aktuell zon av matrisen.

Några av de viktigaste utförandeformerna med avseende på appliceringszonerna för vätska kan sammanfattas: $2 \leq m \leq 6$; n' är 1, 2 eller 3; $n'' > n'$ eller $n'' = n'$; $VZ_{n,P}$ är appliceringszon för prov eventuellt även för Reaktant* eller annan reaktant; $VZ_{n'+1}$, $VZ_{n'+2}$, $VZ_{n'+3}$, $VZ_{n'-1}$, och $VZ_{n'-2}$ är appliceringszoner för vätskor avsedda för transport av Reaktant* eller annan reaktant eller buffert utan reaktant så långt som m , n'' och n' det tillåter.

Transportflöde genom de aktuella typerna av matris kan åstadkommas genom kapillärkrafterns inverkan, exempelvis genom att man startar med en i huvudsak torr matris. Som hjälp kan man placera en sugande kropp i slutändan av flödet. Flöde, som innebär transport i huvudsak av enbart lösta komponenter, kan åstadkommas om ett elektriskt fält appliceras över matrisen.

Testprotokoll.

Med hjälp av uppfinningen kan man uppnå att reaktanter och analyt kan vandra zonvis som enskilda komponenter eller tillsammans i olika kombinationer mot detektionszonen. Exakt sekvens av appliceringszoner bestäms av det testprotokoll man vill utnyttja.

Uppfinningen kan appliceras på såväl kompetitiva (inhibition) som icke-kompetitiva (icke-inhibition) testvarianter oberoende av om dessa är simultana eller sekventiella med avseende på nå-

gon reaktant. Illustrativa system visas nedan schematiskt i form de komplex som bildas. - avser fast förankring till matrisen, --- avser bindning via biospecifik affinitet. För enkelhets skull har det antagits att använda reaktanter är monovalenta med avseende på utnyttjade bindningsställen.

A. Sandwich-protokoll (icke-inhibition):

Reaktant I och Reaktant* har båda biospecifik affinitet mot analyten. x = antal mol Reaktant I på matrisen och y = antal mol analyt (= antal mol Reaktant*), som bundit till Reaktant I.

Komplex i detektionszonen:

Matris(-Reaktant I) _{x} (-Reaktant I---analyt---Reaktant*) _{y}

Simultana varianter:

15 $m = 2$: VZ_2R^*/P VZ_1B DZ

Sekventiella varianter:

$m = 2$: VZ_2R^* VZ_1P DZ.

$m = 3$: VZ_3R^* VZ_2B VZ_1P DZ och alternativ där buffertzonen har positionen 1 eller 3.

20 $m = 4$: VZ_4B VZ_3R^* VZ_2B VZ_1P DZ och alternativ där någon av buffertzonererna är placerad i position 1.

$m = 5$: Samma sekvens som för $m = 4$ med undantag av att en extra buffertzonen är placerad i position 1.

25 **B. Sandwich-protokoll (icke-inhibition):**

Reaktant I uppvisar biospecifik affinitet mot Reaktant II.

Både Reaktant II och Reaktant* har biospecifik affinitet mot analyten. x = antal mol Reaktant I på matrisen, y = antal mol analyt (= antal mol Reaktant*), som bundit till Reaktant I via Reaktant II. $y + z$ är antal mol Reaktant II som bundit till Reaktant I.

Komplex i detektionszonen:

Matris(-Reaktant I)_{x-z-y}(-Reaktant I---Reaktant II)_z(-Reaktant I---Reaktant II---analyt---Reaktant*)_y

Simultana varianter:

- m = 2: Samma som för protokoll A med undantag av att
 5 VZ₂R*/P är VZ₂R*/P/RII eller att VZ₁B är VZ₁RII.
 m = 3: VZ₃R*/P VZ₂B VZ₁RII DZ eller
 VZ₃R*/P VZ₂RII VZ₁B DZ.

Sekventiella varianter:

- m = 2: Samma som för protokoll A med undantag av att VZ₁P
 10 ersättes med VZ₁P/RII.
 m = 3: VZ₃R* VZ₂B VZ₁P/RII DZ eller
 VZ₃R* VZ₂P VZ₁RII DZ eller
 VZ₃R* VZ₂P/RII VZ₁B DZ.
 m = 4, 5, 6: I analogi med protokoll A kan man tänka sig
 15 sekvenser med upp till 6 appliceringszoner för
 vätska.

C. Inhibitionsprotokoll:

- Reaktant I är en analytanalog, som är fast förankrad till
 20 matrisen, Reaktant III uppvisar biospecifik affinitet mot a-
 nalyten och Reaktant* uppvisar biospecifik affinitet mot
 Reaktant III. x = antalet mol Reaktant I på matrisen. y =
 antalet mol Reaktant III (= antal mol Reaktant*), som bundit
 till matrisen via Reaktant I. Betingelserna är valda så att
 25 y är ett mått på mängd analyt i provet.

Komplex i detektionszonen:

Matris(-Reaktant I)_{x-y}(-Reaktant I---Reaktant III---
 Reaktant*)_y

Simultana varianter:

- 30 m = 2: VZ₂R*/RIII/P VZ₁B DZ.

Sekventiella varianter:

$m = 2$: VZ_2R^* $VZ_1/RIII/P$ DZ.

$m = 3, 4$ och 5 : Kan byggas upp i analogi med protokoll A.

D. Inhibitionsprotokoll:

- 5 Reaktant I uppvisar biospecifik affinitet mot både Analyt och Reaktant*. Reaktant* är analytanalog som är löslig. $x + y$ är antalet mol Reaktant I på matrisen, x och y är antalet mol Reaktant* respektive Analyt, som bundit till matrisen. Komplex i detektionszonen:
- 10 $\text{Matris}(-\text{Reaktant I}---\text{Reaktant}*)_x(-\text{Reaktant I}---\text{Analyt})_y$:
- Simultan variant:
- $m = 2$: VZ_2R^*/P VZ_1B DZ
- Sekventiell variant:
- $m = 2$: VZ_2R^* VZ_1P DZ
- 15 $m = 3, 4$ och 5 kan byggas upp i analogi med protokoll A.

Matriser

- Matrisen definierar det rum i vilket flödet transporteras.
- 20 Matrisen kan vara den inre ytan av en enkel flödeskanal (exempelvis en kapillär), den inre ytan av en porös matris med genomgående system av flödeskanaler (porös matris) etc. För enkelhets skull kommer matriser, som är användbara i denna variant av uppfinningen att kallas för flödesmatriser. Porösa
- 25 matriser kan vara i form av monoliter, ark, kolonner, membraner, enskilda flödeskanaler av kapillära dimensioner eller sammansatta system av dylika flödeskanaler etc. De kan även vara i form av partiklar som packats i kolonnhylsor, sammanpressade fibrer etc. Matrisernas inre yta, d.v.s. flödeskanalernas
- 30 yta, bör vara hydrofila, så att vattenhaltiga medier (vanligen vatten) kan absorberas och transporteras genom matriserna. Flödeskanalernas minsta innermått skall vara tillräcklig stort, så att de reaktanter, som används, kan transporteras genom matrisen. Tumregeln är att lämpliga matriser finns att välja bland

de som har flödeskanaler med minsta innermått (ofta som en diameter för runda kanaler) i intervallet 0,4-1000 μm , med företräde för 0,4-100 μm om matrisen uppvisar ett system av sinsemellan kommunicerande flödeskanaler. Flödeskanaler med minsta 5 innermått i den övre delen av intervallet 0,4-1000 μm är främst aktuellt för enkla ogrenade kanaler, genom vilka flöde drivs av externt pålagt tryck eller sug.

Aktuella matriser är ofta uppbyggda av en polymer, exempelvis nitrocellulosa, nylon etc. Materialet i matrisen såväl som flödeskanalernas fysiska och geometriska utformning kan variera utefter flödet beroende på vad en viss del av matrisen skall utnyttjas till (Pharmacia AB WO 9622532; Medix WO 94 15215).

Detektionszon

15 I detektionszonen finns Reaktant I fast förankrad till matrisen med bindningar, som ej tillåter oavsiktlig borttransport av Reaktant I under testbetingelserna. Uppfästning av Reaktant I på matrisen kan vara kovalent, via fysikalisk adsorption, via biospecifik affinitet etc. Liksom i tidigare teknik inom områ-

20 det kan uppfinningen utnyttja kombinationer av bindningstyper, exempelvis kovalent bindning till matrisen av en biospecifik affinitetsreaktant riktad mot Reaktant I. Speciellt kan nämnas matris, som uppvisar fysikalisk adsorptivt eller kovalent bundet streptavidin i kombination med biotinylerad Reaktant I el-

25 ler matris, som uppvisar en på liknande sätt bunden antikropp riktad mot Reaktant I. Förankring av Reaktant I till matrisen kan ske via partiklar som deponerats i/på matrisen och till vilka Reaktant I är kovalent, fysikaliskt adsorptivt eller biospecifikt etc bunden. Partiklarna fäster till matrisen antingen

30 därför att deras storlek valts så att de ej kan transporteras genom matrisen eller också via fysikalisk adsorption. Se bland annat Abbott/Syntex US 4,740,468; Abbott EP 472,376; Hybritech EP 437,287 och EP 200, 381; Grace & Co EP 420,053; Fuji Photo Film US 4,657,739; Boehringer Mannheim WO 9406012. För uppfin-

ningen har den senare varianten med mindre partiklar som fysikaliskt adsorberar till matrisen visat sig vara bra.

I ett och samma transportflöde kan finnas flera detektionszoner (DZ1, DZ2 etc). En eller flera av detektionszonerna kan avse samma eller olika analyter. Är analyterna olika är som regel Reaktant I för respektive DZ olika.

Analytiskt påvisbar reaktant (Reaktant*)

Reaktant* kan i uppfinningen inte vara analyt. Vanligen erhålles analytisk detekterbarhet genom att en naturlig reaktant, exempelvis en antikropp eller ett antigen eller en haptent, förses med en analytiskt detekterbar grupp. Välkända exempel på ofta använda grupper är enzymatiskt aktiva grupper (enzym, kofaktor, koenzym, enzymsubstrat etc), fluorogena, kromofora, kemiluminescenta, radioaktiva grupper etc. Även grupper som påvisas med hjälp av en biospecifik affinitetsreaktant brukar räknas hit, exempelvis biotin, haptent, klass-, subklass- och artspecifika determinanter i immunglobuliner etc.

En fördelaktig markörgrupp är partiklar som eventuellt innehåller någon av de ovan nämnda detekterbara grupperna, såsom fluorofores grupper eller kromogena grupper (färgade partiklar). Användbara partiklar har ofta en storlek i intervallet 0.001-5 μm . Partiklarna kan vara av kolloidala dimensioner, s.k. sol (d.v.s. vanligen sfäriska och monodispersa med storlek i intervallet 0,001-1 μm). Speciellt kan nämnas metallpartiklar (exempelvis guldsol), icke-metallpartiklar (exempelvis SiO_2 , kol, latex och avdödade erytrocyter och bakterier). Även partiklar av icke-kolloidala dimensioner men tonvikt lagd på icke-sedimenterbarhet har använts. Dessa har varit mer eller mindre orange- och gulbundna och mer eller mindre polydispersa (kolpartiklar < 1 μm ; Pharmacia AB, WO 9622532).

För partiklar som markörgrupp hänvisas till Unilever WO 88 08534; Abbott US 5,120,643; Becton Dickinson EP 284,232 m.fl.

I samband med utvecklingsarbetet som lett fram till föreliggande uppfinning har man överraskande funnit att bra resultat kan erhållas om man samtidigt utnyttjar:

- (a) Reaktant* med markörpartiklar enligt ovan som påvisbar
5 grupp, och
 - (b) En detektionszon i vilken Reaktant I förankrats till matrisen via partiklar som i huvudsak har dimensioner som skulle tillåta transport av partiklarna som sådana genom matrisen.
- 10 Vi har uppnått fungerande system, i vilka markörpartiklar och förankringspartiklar har i huvudsak samma dimension. Detta innebär med storsannolikhet att markörpartiklarna kan vara större än förankringspartiklarna och vice versa, så länge som de bara är mindre än de flödeskanaler som matrisen definierar. Systemet
15 kan fungera såväl med som utan fördeponering av Reaktant* i avsedd appliceringszon. Denna utförandeform utgör en del av en uppfinning, som beskrives i vår samtidigt med denna inlämnade patentansökan: "Analysmetod med partiklar" Denna separata patentansökan inkorporeras "by reference".

20

Analyter.

Uppfinningen är främst avpassad för att bestämma biospecifika affinitetsreaktanter av de inledningsvis nämnda slagen. Reaktanterna kan vara en cell eller virus eller del av dessa. Spe-
25 ciellt kan nämnas antigen, såsom ett immunglobulin eller en antikropp. För immunglobuliner kan bestämningen avse en viss Ig- och/eller viss Ig-subklass. För antikroppar kan bestämningen avse en viss specificitet, eventuellt även antikroppens Ig-klass eller Ig-subklass. Aktuella Ig-klasser är IgA, IgD, IgE,
30 IgG och IgM. Aktuella Ig-subklasser är IgG1, IgG2, IgG3 och IgG4.

I sandwich-varianter (enligt protokoll A och B ovan) kan analyten vara en antikropp, som är riktad mot ett allergen/antigen/hapten, och härstamma från en viss art, viss Ig-klass eller
35 viss Ig-subklass. I detta fall kan Reaktant* vara en analytiskt

detekterbar antikropp riktad mot en epitop som är specifik för arten, Ig-klassen eller Ig-subklassen och med Reaktant I (protokoll A) eller Reaktant II (protokoll B) som allergenet/antigenet/haptenet. Alternativt väljer man det omvända, d.v.s.

- 5 Reaktant* är allergenet/antigenet/haptenet och Reaktant I respektive Reaktant II är antikroppen, som är riktad mot analyten. För det fall att analyten är ett antigen i allmänhet kan för protokoll A både Reaktant I och Reaktant* vara antikroppar, som är riktade mot antigenet. För protokoll B är det Reaktant
10 II och Reaktant* som är antikroppar riktade mot antigenet.

Kompetitiva varianter är mest intressanta för lågmolekylära analyter. Illustrativa exempel är antigen och haptent. För protokoll C kan Reaktant I vara antigenet eller haptent, som är fast förankrat till matrisen, Reaktant III kan vara en anti-
15 kropp, som är riktad mot antigenet, och Reaktant* kan vara en antikropp, som är riktad mot Reaktant III. För protokoll D kan Reaktant I vara en antikropp riktad mot analyten och Reaktant* kan vara analyten märkt med en analytiskt detekterbar grupp.

- Uppfinningens metod kan utföras som en del i diagnosticering
20 av allergi eller autoimmun sjukdom.

För uppfinnarna har det varit speciellt intressant att mäta anti-allergen antikroppar av IgE- eller IgG-klass, för de senare gärna med tonvikt på någon av de nämnda subklasserna. Mätning av allergen-specifika antikroppar kan utnyttjas i samband
25 med diagnosticering av IgE-medierad allergi.

Prover

Aktuella prover kan vara av biologiskt ursprung, exempelvis från olika kroppsvätskor (helblod, serum, plasma, urin, saliv,
30 tårvätska, cerebrospinalvätska etc.)--från cellodlingsmedier, uppdräkningsförfaranden inom bioteknik, från vävnadsextrakt, från livsmedel, från miljön (miljöanalysprover) etc. Proverna kan vara förbehandlade för att passa till exempelvis matrisen, testprotokollet som ingår etc.

Kalibratorer

Bestämningsmetoder av den typ, som uppfinningen avser, innebär, att man mäter den påvisbara signalen från den analytiskt detekterbara reaktanten (Reaktant*) och tar den uppmätta signalen (provvärde) som ett mått på mängden analyt i provet. För att överföra mätsignalen till verkliga mängder analyt jämföres signalen vanligen med motsvarande signal (kalibratorvärde) för kända standardmängder analyt (kalibratorer). I samband med föreliggande uppfinningen har man utvecklat ett nytt kalibrator-system, vilket applicerat på denna uppfinning utgör en bästa utförandeform.

Denna separata uppfinning innebär, att den kalibrator, som utnyttjas, har i förväg förankrats till en matris (matriskalibrator), helst av samma slag som den som utnyttjas för provkörning. Vid upptagning av kalibratorvärden får matriskalibrator binda till Reaktant*, varefter mätsignalen från Reaktant* mätes på i och för sig känt sätt. Genom att utnyttja olika mängder matriskalibrator kan man få en serie kalibratorvärden som svarar mot olika förutbestämda mängder analyt i prov (standardmängder, dos-responskurva, kalibreringskurva).

Applicerat på föreliggande uppfinning, innebär vårt nya kalibratorsystem främst att transportflödet passerar en eller flera zoner med en kalibrator, som är fast förankrad till matrisen i respektive kalibratorzon (KZ).

Förankring av en kalibrator till matrisen i en kalibratorzon kan ske enligt samma principer som gäller för att förankra Reaktant I till en detektionszon.

Kalibratorzoner skall vara belägna nedströms appliceringszon för vätska, som avser transport av Reaktant*. I förhållande till detektionszon (DZ) ligger kalibratorzonerna företrädesvis uppströms.

Vår uppfinning avseende kalibratorer finns utförligt beskriven i vår parallellt inlämnade patentansökan med titeln "Metod som utnyttjar en ny kalibrator och Test kit som innehåller kalibratorn". Denna ansökan inkorporeras härmed "by reference".

En andra huvudaspekt av uppfinningen.

Flödesmatrisen enligt ovan innehållande två eller flera appliceringszoner för vätska, eventuellt i form av ett kit där 5 flödesmatrisen ingår tillsammans med den analytiskt indikerbara reaktanten, utgör en andra huvudaspekt av uppfinningen.

Uppfinningen illustreras i den experimentella del och definieras i patentkraven som utgör en del av beskrivningen.

PATENTEXEMPEL 1: SEKVENTIELL METOD MED ZONSEKVENSEN: VZ_4B , VZ_3R^* , VZ_2B ,
 VZ_1P , DZ.

Metoder och material

Adsorption av fenyl-dextran till polystyrenpartiklar: Fenyl-
 5 dextran (substitutionsgrad: 1 fenylgrupp på var femte monosac-
 karidenhet = 20 %, Mw dextran 40 000, Pharmacia Biotech AB,
 Uppsala, Sverige) adsorberades till polystyrenpartiklar (0.49
 μ m Bangs Laboratories, USA) genom end-over-end inkuberingar med
 fenyl-dextran löst i avjoniserat vatten till 1) 5 mg/ml, 10 %
 10 partikelsuspension, RT 1h 2) 5 mg/ml, 5% partikelsuspension,
 RT 1 h 3) 20 mg/ml, 1% partikelsuspension, RT över natt 15 h.
 Partiklarna tvättades därefter två gånger med avjoniserat vat-
 ten. Partikelsuspensionerna centrifugerades mellan varje inku-
 bering och tvätt (12100xg, 25 min, Beckman, J-21, JA-20, 10
 15 000rpm). Partikelsuspensionen sonikerades slutligen (Ultra-
 ljudsbad, Branson 5210, 5min).

Koppling av anti-human IgE antikropp (anti-hIgE) till poly-
 styrenpartikel: Anti-hIgE kopplades till polystyrenpartiklar
 20 belagda med fenyl-dextran med CDAP (1-cyano-4-dimetyl-amino-pyri-
 dinium bromid (Kohn J and Wilchek M, FEBS Letters 154(1) (1983)
 209-210).

Avsaltning och buffertbyte av anti-hIgE utfördes genom gel-
 filtrering (PD-10, Pharmacia Biotech AB) i $NaHCO_3$, 0.1 M, pH
 25 8,5. 2,3 g polystyrenpartiklar (belagda med fenyl-dextran enligt
 ovan) i 2% lösning i 30 vol% aceton aktiverades med 17 ml CDAP
 (0.44 M) och 14 ml TEA (0,2 M Trietylamin, Riedel-deHaën, Tysk-
 land). CDAP tillsattes under omrörning 150 sek och TEA under
 150 sek. Partiklarna tvättades med 30 vol% aceton och centrifu-
 30 gerades vid 12100xg (25 min, Beckman, J-21, JA-20, 10 000rpm).
 17 mg anti-hIgE kopplades till de aktiverade partiklarna (2%,
 0,15g i 0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,5) vid inkubering end-over-end över
 natt +4°C. Partiklarna centrifugerades och dekanterades innan
 de avaktiverades med glutaminsyra 0,05 M och asparaginsyra 0,05

M i 0,1 M NaHCO₃ pH 8,5 vid inkubering end-over-end över natt +4°C. Kopplade partiklar tvättades 1 gång med 0,1 M NaHCO₃, 0,3 M NaCl, pH 8,5, 1 gång med 0,1 M HAc, 0,3 M NaCl pH 5, 1 gång med 0,1 M NaHCO₃ pH 8,5 och en gång med 20 mM boratbuffert pH 8,5.

Partikelkoncentration bestämdes spektrofotometriskt vid A₆₀₀ nm med obehandlade partiklar som referens. Kopplad protein-koncentration bestämdes genom att ha radioaktivt anti-hIgE närvarande vid kopplingen och cpm-mätning.

10

Kolpartikelkonjugat (Reaktant*): Detta framställdes genom att anti-hIgE adsorberades till kolpartiklar (sp100, < 1 µm, Degussa, Tyskland) enligt WO 9622532 (Pharmacia AB). Den slutliga lösningen som användes i flödesmatris innehöll 400 µg kolpartiklar per ml.

Deponering på porös matris (detektionszon): På nitrocellulosaflak (Whatman, 8µm, 5cm lång och 25 cm bred med polyesterbaksida deponerades kolpartikelkonjugat (framställt enligt ovan) i en zon över arkets bredd (blivande detektionszon) med Linear Striper (IVEK Corporation). Flödet var 1 µl/sek och 1 µl/cm. Partiklarna var spädda i boratbuffert (20 mM, pH 8,5, Dextran T5000 4,2 %w/w, sorbitol 5,8 %w/w). Mängd deponerad anti-IgE antikropp var ca 1000 ng/cm. Flaken torkades 1 h, 30°C.

25

Zoner för applicering av buffert, prov och kolpartikelkonjugat: Väl avskilt från zonen, som innehöll deponerat material, placerades parallellt med zonen och parallellt med varandra 4 stycken 1 mm breda inplastorremsor (Mylar med lim på ena sidan, Gelman) på 5 mm avstånd från varandra (zonavgränsare). Inplastorremsorna definierade på detta sätt fyra 5 mm breda zoner. Flaken klipptes vinkelrät mot zonen innehållande deponerat material till remsor med 0.5 cm bredd (längden på remsan blev då 5 cm) (Singulator: Matrix 1201 membrane cutter, Kinematic auto-

mation). De slutliga remsorna uppvisade fyra parallella zoner (appliceringszoner) åtskilda av inplastorremsor som zonavgränsare och en separat zon med deponerad anti-hIgE antikropp (detektionszon). Som jämförelse tillverkades remsor utan zonavgränsare, d.v.s. utan åtskilda appliceringszoner.

Testmetodik: Remsor med åtskilda appliceringszoner monterades på en plan hållare. Upptill (0.5 cm) på remsan (och med detektionszonen som närmaste zon) placerades ett sugande membran (Whatman, 17 Chr, bredd 3 cm). Hållaren gav också ett konstant tryck på de sugande membranen. För simultan applicering av reagens till de fyra delzonerna användes en 4-kanalers Multipipett (Labystems). Multipipetten laddades så att serumprov (30 µl) applicerades i appliceringszonen närmast detektionszonen med ordningen buffert (30 µl), kolpartikelkonjugat (30 µl) och buffert (30+30 µl) i respektive uppströms belägen appliceringszon. För sekventiell applicering till remsorna utan zonavgränsare applicerades först 30 µl prov på nederkanten av remsan. Efter insugning av provvolym tillsattes i tur och ordning efter insugning buffert (30 µl), kolpartikelkonjugat (30 µl) och buffert (30+30 µl). Kolpartikelkonjugatet var framställt enligt ovan och var suspenderat i buffert. Bufferten var natriumfosfat 0,1 M, BSA 3 %, natriumazid 0,05 %, sukros 3 %, natriumklorid 0,2 %, fenyl-dextran 0,05 %, bovint gammaglobulin 0,05 %, pH 7,5. Tidtagningen startade vid appliceringen av prov och tidpunkten när varje zons vätska hade sugits in i membranet noterades. Kolpartikelkonjugatets bindning till detektionszonen kvantifierades genom absorbansmätning (ultroskan XL, Enhanced Laser-Densitometer, LKB). Som prov användes IgE med standardkoncentrationer i plasma miljö (0; 0,5; 2; 10; 50, och 200 KU/L).

Resultat

Med fyra appliceringszoner för vätska och simultan tillsättning, vandrade vätskorna i appliceringszonernas ordning, d.v.s.

provet som var i zonen närmast detektionszonen vandrade först, utan att blandas med efterkommande appliceringszons tvättlösning, som i sin tur startade att vandra, när provet hade transporterats ut ur appliceringszonen för prov. På motsvarande sätt vandrade de övriga zonernas vätskor i sekvens utan att blandas.

Den tid som behövdes för varje delzons vätska att bli transporterad in i detektionszonen från sin respektive position visas i Tabell 1 för matriser med 4 zoner och i Tabell 2 för matriser utan zoner.

Tabell 1

kU/L	0	0,5	2	10	50	200
Vätska						
Prov	0-3m21s	0-3m52s	0-3m47s	0-3m45s	0-3m28s	0-3m19s
1-a tvätt	-7m40s	-7m57s	-7m59s	-8m10s	-7m53s	-7m10s
Konjugat	-11m37s	-11m30s	-12m15s	-12m47s	-12m18s	-11m41s
Total testtid	22m23s	22m40s	23m18s	23m27s	23m01s	21m44s

15

Tabell 2

kU/L	0	0,5	2	10	50	200
Vätska						
Prov	0-1m56s	0-2m15s	0-1m57s	0-1m45s	0-1m42s	0-1m55s
1-a tvätt	-3m52s	-4m12s	-4m07s	-3m52s	-4m05s	-3m50s

Konjugat	-4m55s	-6m03s	-6m25s	-6m35s	-6m23s	-6m15s
Total testtid	10m33s	11m23s	11m45s	11m09s	11m20s	11m35s

Tabell 3: Analysresultat från körningar med gemensam zon för alla påsättningar eller med 4 delzoner (buffert, analytiskt detekterbar reaktant, buffert, prov).

	IgE KU/L	kontroll Abs x1000	4 zoner Abs x1000
	0,5	0	12
10	2	312	207
	10	1241	831
	50	1921	1560
	200	2115	2044

15

I tabell 3 visas att upptaget minskar något för remsor med diskreta appliceringszoner jämfört med när tillsättning sker i en och samma zon. Minskningen är dock marginell. Försöket visar därför att man kan uppnå i stort sett samma resultat om samtidigt tillsättning sker till zonsekvensen AZR* AZP som om prov och Reaktant* sättes i sekvens till en gemensam appliceringszon.

Om fast förankrad anti-IgE antikropp (Reaktant I) byts ut mot ett allergen får man en bestämningsmetod av IgE antikroppar riktade mot allergenet. På analogt sätt kan testsystem avseende antikroppar av annan klass/subklass och med annan specificitet bestämmas. Appliceringszoner för enbart buffert kan utelämnas. För ytterliggare alternativa testprotokoll och analyter se ovan under rubrikerna "Testprotokoll" och "Analyter"

PATENTEXEMPEL 2: PROTOKOLL MED APPLICERINGSZON FÖR VÄTSKA SOM ENBART INNEHÅLLER
BUFFERT NÄRMAS DETEKTIONSZONEN (. . . . VZ₁P DZ).

Preliminära försök tyder på att denna typ av sekvens kan leda till en långsammare vandring genom detektionszonen av reaktanter och analyt tillsatta i uppströms belägna appliceringszoner för analyt och/eller reaktant. Detta kan innebära fördelar med avseende på inbindning av analyt och/eller Reaktant*.

P A T E N T K R A V

1. Förfarande för att bestämma en analyt i ett prov i en flödesmatris med hjälp av ett transportflöde av en eller flera biospecifika affinitetsreakanter, av vilka minst en är analytiskt detekterbar (Reaktant*) och en är fast förankrad i matrisen (Reaktant I), och flödesmatrisen uppvisar:
- 5 A) en appliceringszon för vätska (VZP), som innehåller buffert och prov och eventuellt en eller flera av reaktanterna, dock ej Reaktant I,
- 10 B) en nedströms VZP belägen detektionszon (DZ) med den fast förankrade reaktanten (Reaktant I), och
- C) eventuellt en eller flera zoner i vilka någon av reaktanterna har fördeponerats,
- 15 varvid man (i) initierar flödet mot detektionszonen genom tillsats av vätskan med prov i appliceringszonen VZP för transport av analyt och reaktanter mot detektionszonen (DZ), och (ii) påvisar den mängd Reaktant* som bundit till DZ, varvid den påvisade mängden är relaterad till mängden analyt i provet, **kännetecknat** av att
- 20 I. Transportflödet uppvisar minst två appliceringszoner för vätska:

$$VZ_m \dots VZ_n \dots VZ_1 \quad DZ$$

----- >

där

- 25 a) VZ_n är en appliceringszon för vätska, och n är positionen för appliceringszonen VZ_n ,
- b) m är totala antalet appliceringszoner i vilka flöde initieras ($m \geq 2$),
- c) en VZ_n är appliceringszon för prov ($VZ_n.P$) och en VZ_n
- 30 är för Reaktant* ($VZ_n.R^*$) med $n'' \geq n'$, och
- d) ----- > är riktningen på flödet,
- e) DZ är detektionszonen, och

II. Flöde initieras genom att man sätter vätska till varde-
 ra zonen $VZ_m \dots VZ_n \dots VZ_1$ på sådant sätt att
 vätska_{n+1}, som sätts till appliceringszon (VZ_{n+1}),
 transporteras genom matrisen omedelbart efter vätska_n
 5 som sätts till närmast nedströms belägna
 appliceringszon VZ_n .

2. Förfarande enligt krav 1, **kännetecknat** av att $n'' > n'$
 (sekventiella varianter med avseende på analyt och
 10 Reaktant*).
3. Förfarande enligt krav 1, **kännetecknat** av att $n'' = n'$
 (simultana varianter med avseende på analyt och Reaktant*).
- 15 4. Förfarande enligt något av kraven 1-3, **kännetecknat** av att
 Reaktant* är fördeponerad i sin appliceringszon (VZ_n, R^*).
5. Förfarande enligt något av kraven 1-4, **kännetecknat** av att
 man sätter vätska_{n+1} till VZ_{n+1} före eller i huvudsak samti-
 20 digt med att man sätter vätska_n till VZ_n , med undantag för n
 = m vilken zon saknar zonen VZ_{n+1} .
6. Förfarande enligt något av kraven 1-5, **kännetecknat** av att
 VZ_{n+1} slutar där VZ_n börjar, med undantag för $n = m$ vilken
 25 zon saknar zonen VZ_{n+1} .
7. Förfarande enligt något av kraven 1-6, **kännetecknat** av att
 applicering av vätska sker i huvudsak samtidigt i alla VZ_m
 . . $VZ_n \dots VZ_1$.

8. Förfarande enligt något av kraven 1-7, **känn tecknat** av att
 $m \leq 6$; n' är 1, 2 eller 3; $n'' > n'$; $VZ_{n'+1}$, $VZ_{n'+2}$, $VZ_{n'+3}$,
 $VZ_{n'-1}$, och $VZ_{n'-2}$ är appliceringszoner för vätskor avsedda
 för transport av Reaktant* eller annan reaktant eller buf-
 5 fert utan reaktant, så långt som m , n'' och n' det
 tillåter.
9. Förfarande enligt något av kraven 1-8, **kännetecknat** av att
 10 zonerna VZ_m . VZ_n . VZ_1 har zonavgränsare mellan varandra.
10. Förfarande enligt något av kraven 1-9, **kännetecknat** av att
 sammansättningen av transporterade komponenter från en app-
 liceringszon VZ_n ej är samma som från närmast intilliggande
 15 appliceringszon VZ , i vilken flöde initieras, (VZ_{n+1} och
 VZ_{n-1} , med undantag för $n = m$ och $n = 1$ vilka zoner saknar
 VZ_{n+1} respektive VZ_{n-1}).
11. Förfarande enligt något av kraven 1-10, **kännetecknat** av att
 20 minst en reaktant, annan än Reaktant*, är fördeponerad i en
 appliceringszon $VZ_n \dots R$ för vätska avsedd att transportera
 reaktanten.
12. Förfarande enligt något av kraven 1-11, **kännetecknat** av att
 25 $m \leq 6$ och att n' för appliceringszonen för prov (VZ_n, P) är
 1, 2 eller 3.
13. Förfarande enligt något av kraven 1-12, **kännetecknat** av att
 Reaktant* har biospecifik affinitet mot analyten så att
 30 Reaktant* inkorporeras i ett komplex Reaktant'---analyt---
 Reaktant* i detektionszonen i en mängd som är relaterad

till mängden analyt i provet, i vilket komplex Reaktant har biospecifik affinitet mot analyten och är

- (a) Reaktant I eller
 - (b) en reaktant mot vilken Reaktant I uppvisar biospecifik
- 5 affinitet och vilken transporteras från $VZ_n.P$ eller från en appliceringszon nedströms $VZ_n.P$.

14. Förfarande enligt något av kraven 1-13, **kännetecknat** av att
- a. analyten är vald bland antigen i allmänhet, och
 - b. metoden utföres som en del i diagnosticering av allergi
- 10 eller autoimmun sjukdom.

9
1
5
6
4
0
2
7

1997 -12- 30

S A M M A N D R A G

Förfarande för att bestämma en analyt i ett prov i en flödesmatris med hjälp av ett transportflöde av en eller flera bio-
 5 specifika affinitetsreakanter, av vilka minst en är analytiskt detekterbar (Reaktant*) och en är fast förankrad i matrisen (Reaktant I), och flödesmatrisen uppvisar. Det kännetecknande dragen är att

- 10 A. Transportflödet uppvisar minst två appliceringszoner för vätska:

$$\begin{array}{ccccccc} \text{VZ}_m & . & . & . & \text{VZ}_n & . & . & . & \text{VZ}_1 & & \text{DZ} \\ & & & & & & & & & \text{-----} & > \end{array}$$

där

- 15 a) VZ_n är en appliceringszon för vätska, och n är positionen för appliceringszonen VZ_n ,
 b) m är totala antalet appliceringszoner i vilka flöde initieras ($m \geq 2$),
 c) en VZ_n är appliceringszon för prov (VZ_n, P) och en VZ_n
 20 är för Reaktant* (VZ_n, R^*) med $n'' \geq n'$, och
 d) ----- > är riktningen på flödet,
 e) DZ är detektionszonen, och

- B. Flöde initieras genom att man sätter vätska till vardera
 25 zonen $\text{VZ}_m . . \text{VZ}_n . . \text{VZ}_1$ på sådant sätt att vätska _{$n+1$} , som sätts till appliceringszon (VZ_{n+1}), transporteras genom matrisen omedelbart efter vätska _{n} som sätts till närmast nedströms belägna appliceringszon VZ_n .